

TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN
ZUR ANTIGENIZITÄT FRISCHER UND
CIALITKONSERVIERTER GEHÖRKNÖCHELCHEN
IM ALLOGENEN SYSTEM

Karl Schlierf

1902

Aus der
Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke
der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. H. H. Naumann)

TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN
ZUR ANTIGENIZITÄT FRISCHER UND CIALITKONSERVIERTER
GEHÖRKNÖCHELCHEN IM ALLOGENEN SYSTEM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Karl Schlierf

aus

München

1982

Mit Genehmigung der med.Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. E.R. Kastenbauer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H.H. Naumann

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 8.4.1982



A b s t r a c t

SCHLIERF, KARL:

TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR ANTIGENIZITÄT
FRISCHER UND CIALITKONSERVIERTER GEHÖRKNÖCHELCHEN IM
ALLOGENEN SYSTEM.

Nach anfänglichen Erfolgsmeldungen nach Transplantationen von allogenen Gehörknöchelchen wurden diese im Laufe der Zeit zunehmend nüchterner beurteilt. Audiometrische Verschlechterungen in Verbindung mit rezidivierenden Entzündungen, die zu Nachoperationen zwangen, sicherten nicht selten Hinweise für Transplantatreaktionen.

Es sollte tierexperimentell aufgezeigt werden, ob sich nach mehrfacher Vorimmunisierung mit einer Aufbereitung von Gehörknöchelchen immunologische Reaktionen objektivieren lassen und inwieweit das Konservierungsmittel Cialit in der Lage ist, solche zu verzögern oder aufzuheben. Hierbei dienten BD II (Berlin Duckrey)-Inzuchtratten als Empfängertiere und Sprague-Dawley-Koloniezuchtratten als Spendertiere.

Es zeigte sich, daß sich durch eine Immunisierung von BD II-Ratten mit cialitkonserviertem Ossikula-Homogenat keine präzipitierenden Antikörper produzieren lassen. Dagegen fanden sich im Ouchterlony-Test nach Immunisierung mit frischem unkonserviertem Ossikula-Homogenat humorale Antikörper des Wirtes gegen Lebergewebe des Spendertieres.

Ferner konnte anhand der Immunisierung mit cialitkonserviertem Ossikula-Homogenat und nachfolgender allogener Haut-Transplantation im allogenen System im Vergleich zur Immunisierung mit frischem Ossikula-Homogenat eine wesentlich verzögerte Abstoßungsreaktion beobachtet werden, die sich zeitlich genau mit der Abstoßungsreaktion von allogenen Hauttransplantaten im Sinne der First-Set-Reaktion deckt. Damit wurde dargestellt, daß durch cialitkonserviertes Material offensichtlich nur ein minimaler Immunisierungseffekt erfolgt, so daß keine klassische Second-Set-Reaktion ausgelöst werden kann.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. H.H. Naumann, Direktor der Universitäts-Hals-Nasen-Ohrenklinik, dafür danken, daß mir die Gelegenheit gegeben wurde, im Forschungslaboratorium der Klinik zu arbeiten.

Herrn Professor Dr. med. E. Kastenbauer danke ich für die Überlassung des Themas und für seine wertvollen Anregungen bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn Dr. med. U. Reichardt (Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg/Breisgau) danke ich für die Beratung und Hilfe bei der Durchführung verschiedener immunologischer Untersuchungen.

A EINLEITUNG:

Die Transplantatreaktion - eine Form der Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ als Folge zellvermittelter spezifischer Immunität.

1. Die Transplantation von Gehörknöchelchen.
2. Biochemische Untersuchungen von Knochen und Periost.
3. Minderung der Proteinlöslichkeit durch Cialitkonservierung.

B EIGENE EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN:

1. Zielsetzung der Arbeit.
2. Die Verstärkung von immunologischen Reaktionen durch geeignete Applikationsformen des Antigens und durch Zugaben von Freund'schem Adjuvans.
3. Gewinnung von hochmolekularem Material aus frischen bzw. cialitkonservierten Gehörknöchelchen.
4. Herstellung injektionsfertiger Lösungen aus hochmolekularem Material unkonservierter und cialitkonservierter Gehörknöchelchen.
5. Technik der Immunisierung.
6. Nachweis der antigenen Wirkung von frischem und cialitkonserviertem Gehörknöchelchen-Extrakt im allogenen System im Ouchterlony-Test.
7. Die Übertragung von Haut von Sprague-Dawley-Ratten auf vorimmunisierte BD II-Ratten.

D SCHLUSSTEIL:

1. Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse.
2. Schlußfolgerung.

E LITERATUR-VERZEICHNIS

Abkürzungen im Text:

MHC:	Major histocompatibility complex
HLA:	Human leukocyte antigen
BD II:	Berlin-Duckrey II Inzuchtratten
GKE:	Gehörknöchelchenextrakt
PBS-Puffer:	Phosphate buffered saline, pH 7,2
OF:	Ossikula frisch
OC:	Ossikula cialitkonserviert
NRS:	Normales BD II-Ratten-Serum

A EINLEITUNG:

Allogene Gewebe- und Organtransplantate werden abgestossen, wenn der Empfänger sie als fremd oder histoinkompatibel erkennt. Umgekehrt können histokompatible Transplantate in einem Wirt überleben, wenn sie nicht wie Fremdgewebe abgestossen werden. Histokompatible Transplantate entstammen entweder dem körpereigenen Gewebe (autogen) oder sind eineiigen (genetisch identischen) Zwillingen oder reinen Inzuchttieren entnommen, die genetisch identisch sind (isogen).

Histoinkompatible Transplantate unterscheiden sich in den Transplantations- oder Histokompatibilitätsantigenen, von denen eine Vielzahl in den Wirtsorganismus eingebracht wird. Es scheint in jeder Spezies eine Gruppe von Genen zu existieren, die besonders starke Histokompatibilitätsmerkmale hervorruft und die man den Haupt-Histokompatibilitätskomplex (MHC) nennt. Bei der Maus, bei der dieser Zusammenhang von Genen und Histokompatibilitätsmerkmalen wegen der Verfügbarkeit besonders vieler Inzuchtstämme am eingehendsten untersucht ist, heißt dieser Komplex H-2, beim Menschen HLA. Beim Menschen sind bis heute über 50 Transplantationsantigene nachweisbar. Es gibt Hinweise dafür, daß diese Antigene (HLA-System) in 5 Loci genetisch

fixiert sind, wobei unterschiedlich viele Allel-Kombinationen vorkommen können. Die Antigene des HLA-Systems finden sich auch auf Leukozyten. Neben diesen Leukozyten-Antigenen und den Erythrozyten-Antigenen des ABO-Systems werden noch weitere Histokompatibilitäts-Antigene bzw. -Systeme diskutiert, die Antigene des HLA- und ABO-Systems sind jedoch die stärksten.

Gewöhnlich teilt man die Transplantatreaktion in zwei Phasen ein, eine afferente und eine efferente. Während der afferenten Phase erkennt der Empfänger fremde HL-Antigene des Transplantates und mobilisiert Abwehr- (Effektor) Mechanismen, die das Transplantat während der efferenten Phase angreifen.

Da diese Effektorzellen (Mononukleare Zellen, z.B. Lymphozyten und partiell differenzierte Makrophagen) hauptsächlich dem lymphozytären System entstammen, kann eine wirksame Histokompatibilitätserkennung und Abstossung nur nach Einsprossen von Wirtsgefäßen (speziell Lymphgefäßen) in ein Fremdtransplantat erfolgen. Andererseits hängt die Geschwindigkeit und Stärke einer Abstossungsreaktion nicht nur von kompetenten Zellen und Abwehrmediatoren des Wirts ab, sondern auch von der Antigenizität des Transplantates selbst:

Ein allogenes Transplantat mit geringer antigener Potenz kann zum Beispiel eine stark verzögerte Abstoßungsreaktion beim Wirt hervorrufen. Weiterhin kann ein zweites nachfolgendes Transplantat vom selben allogenen Spender durch die "Gedächtniszellen" des immunologischen Systems eine beschleunigte Abstoßung (Second-Set-Reaktion) bedingen.

Einer Abstoßungsreaktion gegen ein allogenes Transplantat liegen folgende Mechanismen zugrunde:

1. Ein allogenes Transplantat wird nicht sofort abgestossen, es bleibt zunächst für einige Tage vital.
2. Einem allogenen zweiten Transplantat folgt keine längere Latenzzeit mit scheinbarer Annahme des Gewebes, sondern eine beschleunigte Abstoßungsreaktion des Transplantates.
3. Der Abstoßungsmechanismus bei der Second-Set-Reaktion erfolgt generalisiert an jedem vaskularisierten Ort des Organismus.
4. Die beschleunigte Second-Set-Reaktion ist spenderspezifisch.
5. Sehr kleine Hauttransplantate überleben etwas länger, da weniger Transplantatantigene übertragen werden.
6. Bei einer Reihe von Tieren wird die Transplantatabstoßung vom Auftreten von Serumantikörpern begleitet, die mit den Spenderzellen reagieren. Die Antikörper werden von Plasmazellen produziert, die aus der Mitose der B-Lymphoblasten hervorgehen. Die Antikör-

per spielen bei der Transplantatreaktion, mit Ausnahme der "white-graft-reaction", aber nie eine dominierende Rolle. So ist es experimentell nie gelungen, durch Übertragung von Antiserum an tolerante Tiere eine "white-graft-reaction" auszulösen, während dies nach Übertragung von immunologisch kompetenten Zellen (z.B. Lymphozyten-Suspension) sehr wohl möglich ist. Es scheint vielmehr so zu sein, daß diese Antikörper die Rolle von Opsoninen (Serumstoffe) spielen, die zusammen mit Komplement die Phagozytose von Antigenen fördern und zum Teil erst ermöglichen (1, 2).

1. Die Transplantation von Gehörknöchelchen.

Zur Überbrückung von Defekten in der Schallleitungskette werden am häufigsten autogene Knochen- und Knorpelanteile sowie Draht- und Kunststoffprothesen verwendet (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). Dabei wird meist eine Transposition des Amboßkörpers oder eine Stapeserhöhung mit einem Hammerkopf durchgeführt. Die Transplantation verschiedener kompletter Anteile des Schalleitungsapparates von Mensch auf Mensch konnte sich nicht im breiten Umfang durchsetzen, obwohl anfangs optimistische Berichte verschiedener Operateure publiziert wurden (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15). Dabei wurden jedoch nur kurzfristig erzielte funktionelle Ergebnisse und histologische Befunde dargestellt. Auf immunologische Reaktionen, die langfristig gesehen zu Transplantat-

Teildestruktionen und hörmäßigen Mißfolgen führen, wurde zunächst nichteingegangen. Einige Autoren (16, 17) meinten, das Mittelohr sei ein für eine allogene Transplantation besonders geeigneter Ort, da das allogene Transplantat in dem Hohlraumssystem des Mittelohres nur ungenügenden Kontakt mit dem Wirtsgewebe und damit mit dessen Immunsystem bekomme. Daß diese Annahme falsch war, wurde durch eine Reihe von Publikationen klinischer und immunologischer Untersuchungsergebnisse bewiesen. Immer wieder wurde über Destruktionen von allogenen Gehörknöchelchen berichtet, wenn diese im Rahmen einer Mittelohrrevision entfernt werden mußten. Man fand jedoch noch nach mehreren Jahren relativ gut erhaltene allogene Transplantate, so daß deren klinische Anwendung in konservierter Form eine relativ weite Verbreitung fand. Für die Destruktion der allogenen Ossikula sind der breite Kontakt zum Empfängerlager und rezidivierende Mittelohrentzündungen begünstigende Faktoren.

Eine Reduzierung der Antigenizität der Ossikula scheint die Konservierung in Alkohol, Formaldehyd oder Cialitlösung zu bringen. Quantitative biochemische Untersuchungen bezüglich der Löslichkeit der Proteine wurden an der Münchner HNO-Klinik 1972 vorgenommen (18).

2. Biochemische Untersuchungen von Knochen.

Knochen enthält etwa 70% anorganische Verbindungen (davon 90% als Hydroxylapatit, 10% als Fluorapatit, Carbonatapatit und Magnesiumcarbonat), 20% teils extrazelluläre, teils zelluläre organische Bestandteile und 10% Wasser. Die Zusammensetzung des Knochens ist abhängig vom Alter und von seiner Lokalisation im Organismus (19).

Nach biochemischen Untersuchungen von hydrolysierten Gehörknöchelchen im Beckmann-Universal-Analyzer (18) besteht die Trockensubstanz frischer, unkonserverter Gehörknöchelchen aus 11,85% Gesamtproteinen. Kollagen ist dabei das quantitativ bedeutsamste Protein, das sich neben anderen Aminosäuren hauptsächlich aus Prolin, Oxyprolin, Glyzin und Glutaminsäure zusammensetzt. Der Anteil der unlöslichen Proteine beträgt 81,1% - 86,4%, der der löslichen Proteine 13,6% - 18,1%.

Bei der Untersuchung von periostlosen Ossikula und Periost gesondert ergab sich, daß von den löslichen Proteinen 19,6% im Periost und nur 1,6% - 2,6% im periostlosen Gehörknöchelchen enthalten sind.

3. Minderung der Proteinlöslichkeit durch
Cialitkonservierung.

Nach der Konservierung frischer Ossikula in Cialitlösung steigt der Anteil der unlöslichen Proteine auf 91,4% bis 96,8%, der der löslichen Proteine fällt auf 3,2% bis 8,6%. Bei periostlosen Ossikula bleibt der prozentuale Anteil der löslichen Proteine fast unverändert, im Periost jedoch fällt er, verglichen mit frischem Periost, von 19,6% auf unter 1% ab. Der proteolysehemmende Einfluß der Cialitlösung schlägt sich also fast ausschließlich im Periost nieder ("Imprägnierungs-Effekt").

Cialit ist eine Quecksilber-Komplexverbindung (2-Äthyl-mercurimercapto-Benzoxazol-5-carbonsaures Natrium), die nach Hiller (20) eine hohe Affinität zu den Thiolgruppen der Proteine besitzt. Darin scheint die konservierende Wirkung zu liegen. Veränderungen an der Sekundärstruktur von Enzymproteinen mit essentiellen SH-Gruppen bedingen deren Inaktivierung. Bei Strukturproteinen führt diese Umsetzung zur Denaturierung, wodurch in der Regel eine geringere Löslichkeit bedingt wird (21).

Seiffert (22) hat folgende Reihenfolge seiner verschieden präparierten Transplantate bezüglich des Grades ihrer Antigenizität aufgestellt:

Am stärksten antigen wirkt das frische Transplantat, es folgt das tiefgekühlte und lyophilisierte und an letzter Stelle steht das cialitkonservierte Transplantat.

B EIGENE UNTERSUCHUNGEN:

Nach anfänglichen Erfolgsmeldungen nach Transplantation von allogenen Gehörknöchelchen wurden diese im Laufe der Zeit zunehmend nüchterner beurteilt. Audiometrische Verschlechterungen in Verbindung mit rezidivierenden Entzündungen, die zu Nachoperationen zwangen, sicherten nicht selten Hinweise für Transplantatreaktionen. Nach Untersuchungen von Kastenbauer (23) kommt es bei einer allogenen Transplantation von unkonservierten Gehörknöchelchen zwischen dem 8. bis 16. Tag zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Die erste osteoide Gewebeanlagerung an das Transplantat erfolgt zwischen dem 20. und 30. Tag, während beim autogenen Transplantat diese aufgrund des Fehlens immunologischer Abwehrreaktionen bereits ab dem 12. bis 14. Tag stattfindet. Dem osteoklastischen Abbau folgt der osteoblastische Aufbau an der Peripherie und im Zentrum der Transplantate, um die einzelnen Markkanälchen und Markräume im Sinne der angiogenen Knochenneubildung. Die immunologische Attacke gegen das Transplantat dauert dabei so

lange, wie das übertragene Ossiculum antigen wirkt und dem Um- und Einbauprozess unterliegt. Deshalb sind auch noch nach 3 Monaten auffallend viele Lymphozyten und Plasmazellen in den Markkanälchen und an der Oberfläche der übertragenen Gehörknöchelchen zu sehen.

1. Zielsetzung der Arbeit.

Aufbauend auf den Erkenntnissen über den Ablauf eines Transplantateinbaus bzw. Transplantatabbaus hatte die hier vorliegende Arbeit die Zielsetzung aufzuzeigen, inwieweit das Konservierungsmittel Cialit in der Lage ist, die Immunogenität eines allogenen Ossikulumentransplantates zu verzögern oder gar aufzuheben.

Die Versuche wurden im allogenen System durchgeführt. Hierbei dienten BD-II (Berlin-Duckrey) Inzuchtratten als Empfängertiere und Sprague-Dawley-Koloniezuchtratten als Spendertiere. Zwar wären antigene Determinanten im xenogenen System leichter nachzuweisen, die Einheilungsvorgänge der xenogenen Transplantate verlaufen jedoch völlig unterschiedlich zu den allogenen (24). So lassen sich im allogenen System eher Analogien zur allogenen Gehörknöchelchentransplantation in die Paukenhöhle beim Menschen herstellen und exaktere immunologische Aussagen machen.

Die Antigenizität von Gehörknöchelchen-Homogenaten sollte dabei in zweifacher Hinsicht im Tierexperiment aufgezeigt werden:

1. Durch den Nachweis von präzipitierenden Antikörpern im Serum entsprechend vorimmunisierter Tiere im Ouchterlony-Test.
 2. Durch Verpflanzung von Ratten-Rückenhaut der Sprague-Dawley-Zucht auf mit allogenen Ossikula-Homogenaten vorimmunisierte BD-II-Ratten. Hierdurch sollte geklärt werden, zu welchem Zeitpunkt eine Abstossungsreaktion zwischen zwei Rattenstämmen nach Immunisierung mit einem Extrakt aus allogenen Gehörknöchelchen (GKE) auftritt und inwieweit die Second-Set-Reaktion durch den Einfluß von Cialitlösung verzögert wird.
2. Die Verstärkung von immunologischen Reaktionen durch geeignete Applikationsformen des Antigens u. durch Zugabe von Freund'schem Adjuvans.

Der Grad, mit dem eine immunologische Reaktion in Gang gebracht werden kann, hängt außer vom Antigen und von der Spezies des Empfängers auch von der Applikationsart des Antigens ab. Antigene können intrakutan, intramuskulär, intravenös und intraperitoneal appliziert werden. Am wirkungsvollsten sind im Experiment jene Applikationsformen, nach denen das Antigen in nachhaltigsten Kontakt zum lymphatischen System des Empfängers gerät. Es empfiehlt sich deshalb die Injektion des Antigens in Lymphknotennähe, zum Beispiel intraglutäal oder subkutan in die Planta pedis des Versuchstieres.

Den Antigenen können auch Adjuvantien beigegeben werden, die die Einleitung einer Immunreaktion fördern. Ein solches Adjuvans ist beispielsweise Aluminiumhydroxyd, welches zum Beispiel dem Diphtherie-Impfstoff und Tetanus-Toxoid zur Erlangung eines besseren Immunisierungseffektes gegen diese Erkrankungen zugesetzt wird.

Die wirksamsten und bei Tieren am häufigsten verwandten Adjuvantien enthalten Mykobakterien, zum Beispiel in der Form des kompletten Freund'-schen-Adjuvans. Hierbei handelt es sich um eine stabilisierte Wasser in Öl-Emulsion mit abgetöteten Mykobakterien. Nur dieses Adjuvans ist in der Lage, eine Sensibilisierung durch normalerweise nicht-immunogene Substanzen auszulösen. bzw. eine zellgebundene Sensibilisierung zu induzieren (25).

Dies soll auf verschiedene Effekte zurückgehen:

1. Das emulgierte Antigen stellt ein Depot dar, das über einen längeren Zeitraum antigen wirksam ist.
2. Die Tuberkelbazillen bewirken die Wanderung vieler Zellen zur Injektionsstelle. Dadurch wird ein enger Kontakt der Antikörper-bildenden Zellen mit dem Antigen gewährleistet. Die Zahl der eingewanderten Zellen ist so groß, daß die gesamte Region am Injektionsort aus dichten Zellmassen besteht, die man ein Granulom nennt.
3. Kleine Tröpfchen der Adjuvans-Antigen-Mischung geraten in den regionalen Lymphknoten. Die Lymphknoten dort werden dadurch zur Antikörperbildung angeregt.
4. Tröpfchen der Adjuvans-Antigen-Mischung geraten in den Kreislauf und werden in Antikörperbildenden Organen, wie Milz und Knochenmark, zurückgehalten und regen dort die Antikörperbildung an (26).

3. Gewinnung von hochmolekularem Material aus
unkonservierten bzw. cialitkonservierten
Gehörknöchelchen.

Aus der Paukenhöhle von 400 Sprague-Dawley-Koloniezucht-Ratten wurden unter dem Mikroskop Hammer und Amboß entnommen. Die Ossikula wurden mit Hilfe der Analysenwaage in zwei Portionen zu je 0,41g aufgeteilt. Die eine Portion wurde im Gefrierschrank bei -17° C belassen, die andere eine Woche lang in Cialitlösung 1:5000 gelegt und im Kühlschrank aufbewahrt.

Anschließend wurden die unbehandelten sowie die cialitkonservierten Ossikula lyophilisiert. Dadurch konnten die gefriergetrockneten Portionen leicht homogenisiert werden. In je einem Zentrifugenröhrchen wurden die beiden Substanzen mit physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt, zwei Stunden stehen gelassen, dazwischen kräftig durchgeschüttelt und dann 5 Minuten lang bei 4500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde in zwei Dialyseschläuche dekantiert. Zur Entfernung in Wasser löslicher Ionen und kleinerer Peptide wurde zwei Tage lang dialysiert und schließlich der Inhalt in je einem Rundkolben lyophilisiert. Auf diese Weise konnten aus den unkonservierten Ossikula 4,1mg und aus den cialitkonservierten Ossikula 5,4mg hochmolekularen Materials gewonnen werden, entsprechend etwa 1% der ursprünglich eingesetzten Menge. Später wurden zur Herstellung weiteren Antigens nochmals 300 Ratten getötet und das Material nach dem oben beschriebenen Verfahren gewonnen.

Gewinnung von Gehörknöchelchen-Extrakt (GKE)

Gehörknöchelchen frisch (bzw. cialitkonserviert)

↓
lyophilisiert

↓
homogenisiert

↓
mit NaCl 0,9% aufgeschwemmt

↓
zentrifugiert

↓
Dialyse über 2 Tage

↓
lyophilisiert

4. Herstellung injektionsfertiger Lösungen
aus hochmolekularem Material unkonservierter
und cialitkonservierter Gehörknöchelchen.

Für die erste Versuchsserie mußten 2 x 23 BD II-Inzuchtratten immunisiert werden. Es stand jeweils 3,3mg Antigen zur Verfügung, das entspricht pro Tier einer Menge von 0,143mg, die wiederum in 6 Portionen aufgeteilt wurde. Das unkonservierte und cialitkonservierte Antigen wurde jeweils in einer Lösung aufgeschwemmt, die sich wie folgt zusammensetzt:

25ml NaCl 0,9% + 5ml Freund'sches Adjuvans (komplett) = 30ml. Diese Gesamtmenge wurde in 6 Portionen zu je 5ml aufgeteilt und jedem Tier jeweils 0,2ml mittels einer Tuberkulinspritze verabreicht.

Für die zweite Versuchsreihe standen je 4,4mg Antigen für jeweils 15 Ratten zur Verfügung; das entspricht pro Tier einer Menge von 0,293mg. Das Serum wurde nach dem oben beschriebenen Verfahren hergestellt, in 6 Portionen aufgeteilt, tiefgefroren und später injiziert. Weiterhin wurden 6 Röhrchen mit einer Lösung von 1,6mg NaCl 0,9% + 0,8ml Freund'sches Adjuvans (komplett) zubereitet und eingefroren.

5. Technik der Immunisierung.

In wöchentlichem Abstand wurde den Tieren in die Planta pedis jeweils 0,2ml des aus frischem Ossikula bzw. cialitkonservierten Ossikula zubereiteten Extraktes subkutan injiziert. Insgesamt erhielt jedes Tier 6 Injektionen. Die letzten beiden Injektionen erfolgten bei den meisten Ratten intraglutäal, nachdem an den Pfoten heftige Entzündungsreaktionen aufgetreten waren. Drei Wochen nach der letzten Injektion wurden die Tiere in Ätherkurz- und Chloralhydratnarkose über die Aorta abdominalis entblutet, das gewonnene Blut bei 3000 U/min. 10 Minuten lang zentrifugiert und das Serum in kleinen Portionen bei -17° C eingefroren.

4 BD II-Ratten wurden 6 x 0,3ml NaCl 0,9% + Freund'sches Adjuvans in die Planta pedis gespritzt, um später eventuell eine Antikörperbildung gegen Freund'sches Adjuvans ausschließen zu können.

6. Nachweis der antigenen Wirkung von unkon-
serviertem und konserviertem Gehörknöchel-
chen-Extrakt im allogenen System im Ouchter-
lony-Test.

Methode: Zur Untersuchung standen die Antiseren von BD II-Inzuchtratten, die mit einer Aufbereitung von 0,293mg unkonserverter sowie cialitkonserverter Gehörknöchelchen von Sprague-Dawley-Ratten immunisiert worden waren. In diesen Seren sollten Antikörper gegen Gehörknöchelchen sowie Antikörper gegen Sprague-Dawley-Gewebe und Sprague-Dawley-Serum nachgewiesen werden. Zum Nachweis etwaiger präzipitierender Antikörper benutzten wir die zweidimensionale Doppeldiffusionstechnik nach Ouchterlony. Dazu beschichteten wir Objektträger mit Agargel. Um ein zentrales Loch herum wurden konzentrisch 6 Außenlöcher gestanzt, aus denen das Agargel herausgesaugt wurde. In das zentrale Loch wurde Anti-GKE (frisch)-Antiserum (IgG-Fraktion) der BD II-Ratten bzw. Anti-SKE (cialitkonservert)-Antiserum (IgG-Fraktion) der BD II-Ratten aufgetragen. In die Außenlöcher wurde jeweils eine Verdünnungsreihe von GKE(frisch) der Sprague-Dawley-Ratte sowie von Sprague-Dawley-Ratten-Serum und Sprague-Dawley-Leberextrakt pipettiert. Von jedem Loch aus findet konzentrisch eine Diffusion statt und dort, wo Antigen und Antikörper sich in geeigneten Äquivalenzen treffen, bilden sich Präzipitationslinien.

Isolierung der IgG-Fraktion aus den Antisera:

Um die in den Antisera enthaltenen spezifischen Antikörper anzureichern und zur besseren Quantifizierung im Präzipitationstest (Ouchterlony-Doppeldiffusion) wurden 75ml der gepoolten Antisera der BD II-Ratten per Ionenaustauscher chromatographisch aufgetrennt: Wir benutzten dazu eine Quaternary aminoethyl Matrix (QAE-Sephadex A-50 der Firma Pharmazia), einen starken basischen Ionenaustauscher, der IgG in einem einzigen chromatographischen Vorgang definitiv abtrennt (33,34).

Nach durchgeführter Chromatographie der verschiedenen Antisera wurden die IgG-Fraktionen gegen PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline, pH 7,2) dialysiert und auf eine Konzentration von 1g% eingeengt. Die Prüfung dieser Fraktion in der Immun-Elektrophorese zeigte eine reine IgG-Fraktion. Diese wurde in der genannten Konzentration zur Prüfung auf präzipitierende Antikörper gegen GKE_(frisch) Sprague-Dawley Leber sowie Sprague-Dawley-Ratten-Serum verwandt.

Gewinnung von Leberhomogenat:

Das Leberhomogenat wurde durch Zerkleinern von 5 g Sprague-Dawley-Leber, 30' Zentrifugieren bei 3000 U/Min. und anschließender Dialyse des Überstandes über 24^h mit nachfolgender Lyophilisierung gewonnen, woraus schließlich eine Proteinlösung von 1,2g% resultierte. Die Proteinbestimmung erfolgte per Biuret-Methode.

Ia) Anti-GKE_(frisch)Antiserum (IgG)-Fraktion
der BD II-Ratten gegen GKE-Antigenlösung
der Sprague Dawley-Ratten:

		1 = 1mg/ml
6	1	2 = 1/2mg/1ml
○	○	3 = 1/4mg/1ml
5	7	4 = 1/8mg/1ml
○	○	5 = 1/16mg/1ml
4	3	6 = 1/32mg/1ml
○	○	7 = Anti-GKE _(frisch) Antiserum (IgG).

Ib) Anti-GKE_(cialitkonserviert)Antiserum (IgG)
der BD II-Ratten gegen GKE-Antigenlösung
der Sprague Dawley-Ratten analog zu Ver-
such Ia.

IIa) Anti-GKE_(frisch)Antiserum (IgG) der BD II-
Ratten gegen Leberextrakt der Sprague Dawey-
Ratten (Ausgangskonzentration 1,2g% Protein-
lösung):

		1 = 1,2g%
6	1	2 = 0,6g%
○	○	3 = 0,3g%
5	7	4 = 0,15g%
○	○	5 = 0,075g%
4	3	6 = 0,375g%
○	○	7 = Anti-GKE _(frisch) Antis.(IgG).

IIb) Anti-GKE_(cialitkonserviert)Antiserum der
BD II-Ratten gegen Leberextrakt der Sprague
Dawley-Ratten analog zu IIa.

III) Anti-GKE_(frisch)Antiserum (IgG) der BD II-Ratten gegen Serum der Sprague Dawley-Ratten (Ausgangs-Serumprotein-Konzentration 53g/l):

- | | | |
|---|--|---|
| <p>1:64
○</p> <p>1:32
○</p> <p>1:16
○</p> | <p>1:2
○</p> <p>1:4
○</p> <p>1:8
○</p> | <p>a) außen Verdünnungsreihe Sprague Dawley-Ratten-Serum
1 : 2 bis 1 : 64
zentral Anti-GKE_(frisch)Antiser.
(IgG)</p> <p>b) außen Verdünnungsreihe Sprague Dawley-Ratten-Serum
1 : 2 bis 1 : 64
zentr. Anti-GKE_(c)ialitkons.)Antiser.
(IgG).</p> |
|---|--|---|

IV) Parallel dazu wurden Ossikula_(frisch)Antigen, Leberextrakt und Sprague Dawley-Ratten-Serum gegen natürliches Serum von BD II-Ratten getestet, um eventuell vorgebildete Antikörper zu erfassen.

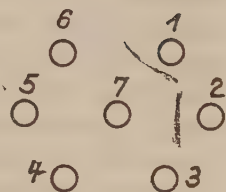
Ergebnisse:

Die Prüfung der gewonnenen Seren auf Antigen-Antikörper-Reaktion ergab folgende Ergebnisse:

1. Eine Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen GKE_(frisch) der Sprague Dawley-Ratten und Anti-GKE_(frisch)Antiserum (IgG-Fraktion) der BD II-Ratten konnte nicht festgestellt werden.
2. Im Ouchterlony-Test zeigte sich zwischen Sprague Dawley-Leberextrakt und Anti-GKE_(frisch)Antiserum (IgG) der BD II-Ratten eine schwache Reaktion.
3. Der Test mit Sprague Dawley-Ratten-Serum in verschiedenen Konzentrationen gegen Anti-GKE_(frisch)Antiserum (IgG) der BD II-Ratten verlief negativ.

4. Im Ouchterlony-Test von Anti-GKE_(c)ialitkons.)-Antiserum (IgG) der BD II-Ratten gegen Verdünnungsreihen von GKE-Antigen der Sprague Dawley-Ratten, Sprague Dawley-Leber sowie Sprague Dawley-Ratten-Serum trat in keinem Fall eine Präzipitationslinie auf.
5. Im Serum nicht immunisierter BD II-Ratten konnten im Ouchterlony-Test gegen Sprague Dawley-Ratten-GKE_(frisch), Sprague Dawley-Ratten-Leber und Sprague Dawley-Ratten-Serum ebenfalls keine Präzipitate nachgewiesen werden.
6. Im Serum von nur mit Freund'schem Adjuvans vorbehandelter BD II-Ratten konnte im Ouchterlony-Test gegen die obengenannten Substanzen keine Fällungsreaktion nachgewiesen werden.

Antigen von Spr.D.-Ratten	Anti-GKE _(OF) - Antiser. der BD II-Ratten	Anti-GKE _(OC) - Antiser. der BD II-Ratten	NRS der BD II-Ratten	
GKE _(frisch)	keine Reaktion	keine Reakt.	keine Reakt.	
Leber	1 Präzip.Lin.bei 1 1 " " bei 2	" "	" "	" "
Serum	keine Reaktion	" "	" "	" "



Versuch IIa:

Anti-GKE_(frisch)-Antiserum (IgG)
der BD II-Ratten

gegen

Leberextrakt der Sprague-Dawley-
Ratten:

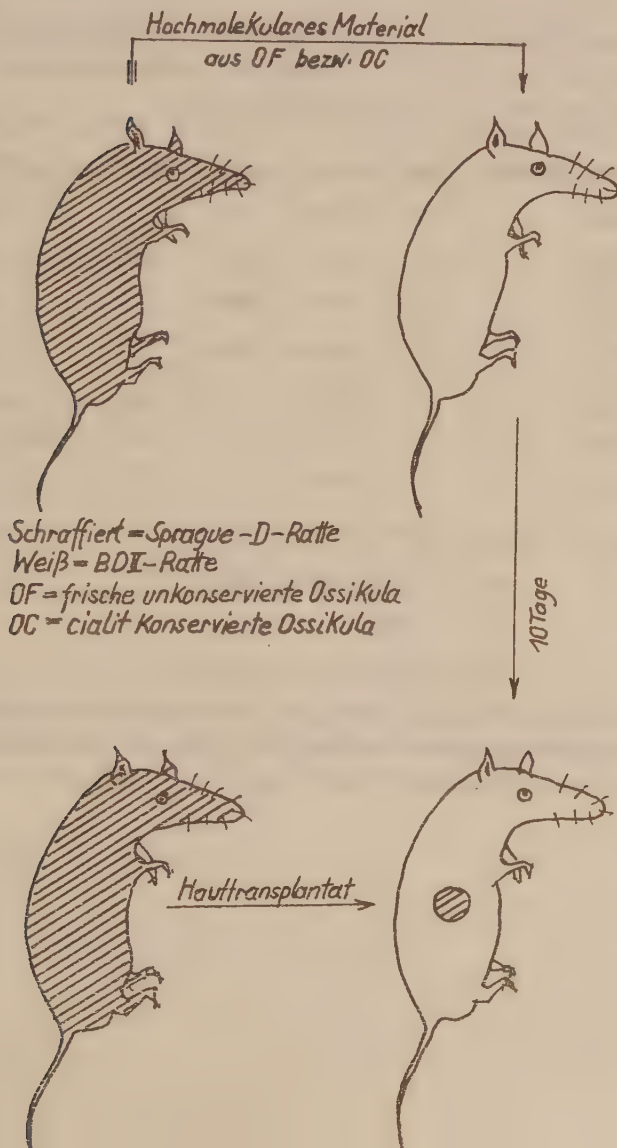
schwache Präzipitationslinien bei
1 und 2.

7. Die Übertragung von Haut von Sprague-Dawley-Ratten auf vorimmunisierte BD II-Ratten.

10 Tage nach Abschluß der Vorimmunisierung (pro Tier insgesamt 0,143mg Antigen aus allo-genen Ossikula) wurden aus den mit OF-immunisierten BD II-Ratten 8 und aus den mit OC-immunisierten BD II-Ratten 6 Tieren Haut von Sprague-Dawley-Ratten auf den Rücken übertragen. Dazu wurden nach Äther-Kurzsnarkose intraperitoneal 1,5 - 3ml Chloralhydrat injiziert. Der mit einer Enthaarungscreme vorbehandelten Rückenhaut der Sprague-Dawley-Ratten wurden mittels einer Hautstanze kreisrunde Hautareale entnommen und den BD II-Ratten an entsprechender Stelle übertragen. Am selben Empfängertier wurde gleichzeitig ein autogenes Hauttransplantat vorgenommen, um später zur Kontrolle eine Vergleichsreaktion zu haben. Die Transplantate wurden mit Histoacryl-Gewebekleber (Fa. Braun, Melsungen) fixiert. Um die Hauttransplantate dem Zugriff der Tiere zu entziehen, wurden aus feinem Drahtgitter und braunem Heftpflaster passende Schutzgitter konstruiert und am Rücken der Ratte festgeklebt, so daß diese das Transplantat weder durch Beissen noch durch Kratzen beschädigen konnte. Der Verband wurde zweimal täglich gewechselt und die Transplantate dabei gleichzeitig auf Nekrose hin von zwei Personen begutachtet. Das entscheidende Kriterium für eine 100%ige Abstossung war die vollständige Dunkelfärbung und Nekrose des Transplantates.

Ebenso wurde einige Wochen später mit den Tieren der zweiten Versuchsserie verfahren, die mit 0,293mg hochmolekularem Material immuni-

siert waren. Hier wurden an 9 mit OC-immunisierten Ratten bzw. an 7 mit OF-immunisierten Tieren Hauttransplantationen vorgenommen.



Die Hauttransplantationen erbrachten folgende
Ergebnisse:

Versuchsserie Ia:

Abstossungszeit der allogenen Hauttransplantate bei
BD II-Ratten, die mit 0,143mg von hochmolekularem
Material aus OF-vorimmunisiert waren:

Nekrosegrad am	8.Tag	9.Tag	10.Tag	11.Tag	12.Tag	13.Tag
Ratte 1	50%	100%				
Ratte 2	0	0	0	50%	50%	100%
Ratte 3	0	50%	100%			
Ratte 4	0	0	100%			
Ratte 5	0	100%				
Ratte 6	0	0	0	50%	50%	100%
Ratte 7	0	100%				

Daraus folgert, daß 100% nekrotisch die Transplantate

am 9. Tag von 3 Tieren

am 10. Tag von 2 Tieren

am 13. Tag von 2 Tieren

wurden. Dies entspricht im arithmetischen Mittel ei-
ner Abstossungsreaktion nach 10,4 Tagen. Die Zahl der
Tiere ist allerdings nicht hoch.

Versuchsserie Ib:

Abstoßungszeit der allogenen Hauttransplantate bei BD II-Ratten, die mit 0,143mg von hochmolekularem Material aus OC-vorimmunisiert waren:

	Nekrosegrad am 9.Tag	10.Tag	11.Tag	12.Tag	13.Tag
Ratte 1	0	0	0	50%	100%
Ratte 2	50%	100%			
Ratte 3	0	50%	100%		
Ratte 4	100%				
Ratte 5	50%	100%			

Daraus folgert, daß 100%ig nekrotisch die Transplantate

am 9. Tag von 1 Tier
am 10. Tag von 2 Tieren
am 11. Tag von 1 Tier
am 13. Tag von 1 Tier

wurden. Dies entspricht im arithmetischen Mittel einer Abstoßungsreaktion nach 10,6 Tagen, soweit bei der kleinen Zahl der Versuchstiere überhaupt ein Mittel festgestellt werden soll.

Versuchsserie IIa:

Abstossungszeit der allogenen Hauttransplantate
bei BD II-Ratten, die mit 0,293mg von hochmole-
kularem Material aus OF vorimmunisiert waren:

Nekrosegrad am	5.Tag	6.Tag	7.Tag	8.Tag	9.Tag	10.Tag	11.Tag
Ratte 1	0	0	40%	50%	50%	100%	
Ratte 2	0	0	0	0	0	100%	
Ratte 3	50%	50%	100%				
Ratte 4	50%	50%	50%	50%	80%	100%	
Ratte 5	50%	50%	70%	70%	70%	95%	100%
Ratte 6	0	0	50%	80%	80%	100%	
Ratte 7	0	50%	80%	80%	100%		

Daraus folgert, daß 100%ig nekrotisch die Transplantate

am 7. Tag von 1 Tier

am 9. Tag von 1 Tier

am 10. Tag von 4 Tieren

am 11. Tag von 1 Tier

wurden. Dies entspricht im arithmetischen Mittel ei-
ner Abstossungszeit nach 9,4 Tagen.

Versuchsserie IIb:

Abstossungszeit der allogenen Hauttransplantate bei
BD II-Ratten, die mit 0,293mg von hochmolekularem
Material aus OC vorimmunisiert waren:

Nekrosegrad am:	8.Tag	9.Tag	10.Tag	11.Tag	12.Tag	13.Tag	14.Tag	15.Tag
Ratte 1	50%	100%						
Ratte 2	50%	50%	50%	50%	100%			
Ratte 3	0	0	0	0	0	0	100%	
Ratte 4	0	0	0	0	100%			
Ratte 5	0	0	0	0	100%			
Ratte 6	0	0	0	0	0	0	0	100%
Ratte 7	0	0	40%	40%	100%			
Ratte 8	0	0	100%					
Ratte 9	0	0	0	0	100%			

Daraus folgert, daß 100%ig nekrotisch die Transplantate

am 9. Tag von 1 Tier

am 10. Tag von 1 Tier

am 12. Tag von 5 Tieren

am 14. Tag von 1 Tier

am 15. Tag von 1 Tier

wurden. Dies entspricht im arithmetischen Mittel einer
Abstossungsreaktion nach 11,9 Tagen.

Nach Untersuchungen der Münchner HNO-Klinik (Kastenbauer 1972) erfolgt die Abstossung von übertragener Rückenhaut im allogenen System (Sprague-Dawley-Ratten gegen BD II-Ratten) ohne Vorsensibilisierung als First-Set-Reaktion nach durchschnittlich 11,5 Tagen, nach einer zweiten Hauttransplantation im Sinne einer Second-Set-Reaktion bereits nach 8,3 Tagen.

Durchschnittliche Abstossungszeit von transplantiertem Sp.-D.^{x)}-Rückenhaut auf BD II-Ratten in Tagen

nach Immunisierung pro
Tier mit insgesamt:

0,143mg OF ^{x)}	10,4	Tage
0,143 mg OC ^{x)}	10,6	Tage
0,293mg OF	9,4	Tage
0,293mg OC	11,9	Tage

OF (Durchschnitt aus beiden Versuchsreihen mit 14 Tieren)	10,0	Tage
OC (Durchschnitt aus beiden Versuchsreihen mit 14 Tieren)	11,5	Tage

First-Set-Reaktion nach allogener Hautübertragung	11,5	Tage
Second-Set-Reaktion nach allogener Hautübertragung	8,3	Tage

x) Sp.-D. = Sprague-Dawley-Ratte

OF = Ossikula frisch

OC = Ossikula cialitkonserviert

D SCHLUSSTEIL:

1. Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse und deren Diskussion.

- a) Eine Immunisierung mit Homogenat aus unkonservierten Ossikula führt zu einer Stimulation des gesamten Immunsystems des Versuchstieres, was sich durch eine verstärkte Second-Set-Reaktion, zum Beispiel bei einem Zweittransplantat von Haut, objektivieren läßt. Damit wird wahrscheinlich, daß durch die Transplantation von Gehörknöchelchen antigenes Material übertragbar wäre, wenn man auf die Konservierung verzichten würde.

Da es sich bei den konserviert übertragenen Ossikula beim Menschen jedoch um ein schwaches und kleines Antigen handelt, kommt es sicherlich nicht zu einer generalisierten Immunisierung des Empfängers, sondern im ungünstigsten Falle höchstens zu einer lokalisierten Reaktion in Form einer über einen längeren Zeitraum verlaufenden Destruktion des allogenen Transplantates.

Zur Charakterisierung dieses antigenen Materials läßt sich aus früheren quantitativen Aminosäuren-Analysen (18) feststellen, daß der wesentlichste quantitative Anteil aus Kollagen besteht. Da Kollagen per se nur als ein schwaches Immunogen wirkt (27), sind möglicherweise

andere, den starken HL-Antigenen zuzurechnende Immunogene bei der nach Erstimmunisierung mit Homogenaten aus frischen Ossikula erzielten verstärkten Second-Set-Reaktion mitbeteiligt.

Zu diesen starken Immunogenen zählen unter anderem Oberflächenantigene von übertragenen Leukozyten und Erythrozyten. Eine relativ geringe Primärstimulation scheint dabei offenbar zu genügen, um bei einer Sekundärstimulation mit Haut eine diskrete aber doch deutliche "Second-Set-Reaktion" zu erzeugen.

- b) Neben dem Nachweis der möglichen antigenen Potenz von Gehörknöchelchen-Homogenaten sollten die hier dargelegten tierexperimentellen Untersuchungen die antigenmindernde Wirkung des Konservierungsmittels Cialit im allogenen System aufzeigen. Danach läßt sich feststellen, daß im allogenen System der Ratte die Antigenizität von unkonservierten frischen Ossikula durch eine einwöchige Inkubation in Cialitlösung (1:5000) so gut wie komplett aufgehoben werden kann.

Die Primär-Stimulation mit frischem Ossikula-Homogenat im allogenen Wirt ist geringer als wenn diese mit einem Hauttransplantat bewirkt worden wäre, da die Menge an antigenem Material im Ossikula-Homogenat bedeutend niedriger ist.

Die verhältnismäßig geringe zeitliche Differenz von 1,1 Tagen der "Second-Set-Reaktion" im Vergleich zur "Primary-Set-Reaktion" mit Haut spricht für die antigene Potenz von frischen Ossikula-Homogenaten.

Selbst höhere Mengen (0,293 mg pro Tier) von cialitfixiertem Material verringern die durchschnittliche Überlebenszeit des Zweit-Hauttransplantates (Second-Set-Reaktion von 11,9 Tagen) im Vergleich zur First-Set-Reaktion der einfachen allogenen Hauttransplantation von 11,5 Tagen nicht.

Dies spricht für die Tatsache, daß ein Homogenat aus cialitkonservierten allogenen Gehörknöchelchen bei den BD II-Ratten nicht immunogen und antigen wirksam wird, da ansonsten ähnlich der Second-Set-Reaktion bei der zweimaligen Hauttransplantation eine vorzeitige Abstoßung der Hauttransplantate der Sprague-Dawley-Ratten hätte auftreten müssen.

Wie bereits von mehreren Autoren dargelegt, mindert eine Lösung von Cialit die antigene Potenz von Proteinen, ohne dabei die osteogenetische Potenz der knöchernen Transplantate zu beeinträchtigen (18, 28, 29, 30). Die Ursache dieser Wirkung kann bislang nur hypothetisch beantwortet werden. Laut tierexperimenteller Untersuchungsergebnisse wirken die

knöchernen Transplantate zunächst als Platzhalter, wobei durch einwachsendes Mesenchym in die Haver'schen Kanäle in umschriebenen Zonen eine Knochenneubildung des Wirtes erfolgen kann.

Nach diesen hier vorgelegten tierexperimentellen Untersuchungen lassen sich die optimistischen Aussagen bezüglich der Cialitkonservierung und Antigenizitätsminderung bestätigen:

1. Durch eine Immunisierung von BD II-Ratten mit cialitkonserviertem Ossikula-Homogenat lassen sich keine präzipitierenden Antikörper produzieren. Dagegen finden sich nach Immunisierung mit frischem unkonservierten Ossikula-Homogenat schwache Titer präzipitierender Antikörper des Wirtes im Ouchterlony-Test gegen Lebergewebe des Spendertieres. Die hier nachgewiesenen präzipitierenden Antikörper sind wahrscheinlich nicht gegen Serum-Proteine, sondern gegen dem HLA-System zuzuordnende Oberflächenantigene oder auch in den Zellen befindliche Partikel, wie Mitochondrien und DNS, gerichtet.

Der fehlende Nachweis von präzipitierenden Antikörpern im Serum vorimmunisierter BD II-Ratten gegen frischen, unkonservierten Gehörknöchelchenextrakt (GKE *frisch*) von Sprague-Dawley-Ratten ist möglicherweise in den geringen Antigenkonzentrationen begründet.

2. Anhand von primärer Immunisierung mit cialitkonserviertem Ossikula-Homogenat und nachfolgender sekundärer Stimulierung mit Haut-Transplantaten im allogenen System konnte im Vergleich zum frischen Ossikula-Homogenat eine wesentlich verzögerte Abstoßungsreaktion beobachtet werden, die sich zeitlich exakt mit den Abstoßungsreaktionen von allogenen Hauttransplantaten im Sinne der First-Set-Reaktion deckt. Damit zeigt sich einmal, daß im cialitkonservierten Präparat offensichtlich eine sehr geringe und verzögerte Antigenfreisetzung erfolgt, so daß keine klassische Second-Set-Reaktion ausgelöst werden kann. Zum anderen verdeutlicht sich, daß frisches Ossikula-Homogenat im Gegensatz zum cialitkonservierten Präparat nicht nur eine zelluläre, sondern auch eine humorale Immunstimulation bewirkt, wie der Nachweis von präzipitierenden Antikörpern im Ouchterlony-Test zeigt.

2. Schlußfolgerung

Bisher in großer Zahl durchgeführte Transplantationen konservierter Ossikula im Mittelohrbereich haben trotz Nichtbeachtung der Identität vom HLA-Typus befriedigende Resultate erbracht, wobei jedoch bei der Langzeitbeobachtung chronische Entzündungsreaktionen am Transplantat auftreten können (31, 32).

Nach den dargestellten tierexperimentellen Untersuchungen besteht - wenn überhaupt - eine stark reduzierte Antigenizität von Gehörknöchelchen-Transplantaten im allogenen System, deren Reduzierung in der Konservierung mit Cialitlösung oder adäquaten Lösungen zu liegen scheint.

LITERATUR-VERZEICHNIS

- (33) Allen, P.C., E.A. Hill, A.M. Stokes: Plasma proteins. Analytical and preparative techniques. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, 1977.
- (15) Austin, D.F.: Ossicular reconstruction. Acta Oto-Rhino-Laryng. belg. 24 (1970) 86.
- (5) Belucci, R.: Polyethylene tubing in bypass surgery of the stapes. Arch. Otolaryng. 73 (1960) 513.
- (12) Betow, K.: Transplantation von Trommelfell und Gehörknöchelchenkette bei Tympanoplastiken. Berlin: W. de Gruyter (1970).
- (16) Brandow, E.: Homograft tympanic membrane transplant in myringoplasty. Acta Oto-Rhino-Laryng. belg. 24 (1970) 38.
- (1) Brendel, W.: Transplantation und Immunologie. Arch. klin.exp.Ohr.-,Nas.- u.Kehlk. Heilk. 196 (1970) 39.
- (19) Buddecke, E.: Grundriss der Biochemie. Walter de Gruyter, Berlin - New York (1974).
- (31) Campbell, E.E.: Tympanoplasty using homograft tympanic membranes and ossicles. The Laryngosc. 88 (1978) No.8/1.
- (17) Cornish, A.: Zit. nach E. Brandow. Acta Oto-Rhino-Laryng. belg. 24 (1970) 38.

- (28) Feenstra, L.: Comparison of Homograft Preservation Techniques. Otolaryng. Clin. of North America Vol.10 (1977) No.3.
- (2) Fudenberg, H.H., D.P. Stites, J.L. Caldwell J.V. Wells: Basic and clinical immunology. Lange Med. Publ. (1980).
- (11) Glaninger, J.: Ein Fall von Stapesplastik unter Verwendung eines kältekonservierten Homoiotransplantates mit 6 Jahre anhaltendem Hörerfolg. Z. Laryng. Rhinol. 46 (1967) 760.
- (3) Guilford, F.R.: Tympanoplasty use of prostheses in conduction mechanism. Arch.Otolaryng. 69 (1959) 70.
- (20) Hiller, E.: Neue Erkenntnisse über Wirkungseffekte des menschlichen Albumins. Münch. med. Wschr. 96 (1954) 1083.
- (9) House, W.F.: Homograft transplant of the middle ear. Acta Oto-Rhino-Laryng. belg. 24 (1970) 132.
- (25) Jäger, L.: Klinische Immunologie und Allergologie, Teil I. Gustav Fischer Verl., Jena (1976).
- (34) Joustra, M., H. Lundgren: Preparation of freeze-dried, monomeric and immunochemically pure IgG by a rapid and reproducible chromatographic technique. In "Protides of the biological fluids" Proceedings of the 17th Colloquium, Peeters, H., Ed., Bruges 1969, pp 511-515.

- (26) Kabat, E.A.: Einführung in die Immunchemie und Immunologie. Springer Verl., Berlin - Heidelberg - New York (1971).
- (23) Kastenbauer E.R.: Tierexperimentelle Untersuchungen über das immunologische Verhalten allogener Gehörknöchelchen-Transplantate. Arch.klin.exp.Ohr.-, Nas.- u.Kehlk.Heilk. 201 (1972) 332-350, Springer Verl.
- (18) -- K. Hochstrasser: Der Einfluß des Konservierungsmittels Cialit auf die Proteinlöslichkeit und die Antigenizität von allogenen und xenogenen Gehörknöchelchen- und Trommelfelltransplantaten. Arch.klin.exp.Ohr.-, Nas.- u.Kehlk.Heilk. 203 (1973) 225-231. Springer Verl.
- (7) Kley W., W. Draf: Histologische Untersuchungen über autotransplantierte Gehörknöchelchen und Knochenstücke im Mittelohr beim Menschen. Acta Otolaryng. (Stockh.) 59 (1965) 593.
- (21) Marquardt, P.: Arzneimittel-Forschung 8 (1954) 481, Zit. nach Seiffert: Hefte z. Unfallheilk. 93 (1967).
- (13) Marquet, J.: Problemes particuliers se rapportant aux homogreffes tympano-ossiculaires. Acta Oto-Rhino-Laryng. belg. 24 (1970) 99.
- (32) Naujoks, J., S. Hornung, E. Eitschberger: Eine klinische Studie über allogenetische Ossikelimplantationen. Laryng.-Rhinol 57 (1978) 114-119, Georg Thieme Verl., Stuttgart.
- (8) Flester, D.: Die Anwendung prothetischen Materials im Mittelohr. Mschr.Ohrenheilk. 2 (1968) 105.

- (14) Flester, D.: Tympanic Membrane homografts in ear surgery. Acta Oto-Rhino-Laryng. Belg. 24 (1970) 66.
- (29) --E. Steinbach: Histologic fate of tympanic membrane and ossicle homografts. Otolaryng. Clin. of North America - Vol.10, No.3 Oct. 1977.
- (6) Schuhknecht, H.F.: The metal prostheses for stapes ankylosis. Arch.Otolaryng. 71 (1960) 287.
- (24) Schweiberer, L.: Experimentelle Untersuchungen von Knochentransplantaten mit unveränderter und mit denaturierter Knochengrundsubstanz. Hefte Unfallheilk. H.103 (1970), Springer Verl., Berlin - Heidelberg - New York.
- (22) Seiffert, K.E.: Biological aspects of collagenous homografts. Acta Oto-Rhino-Laryng. Belg. 24 (1970) 27.
- (30) Steinbach, E., G. Weber: Vergl. Untersuchungen über das Verhalten von homoioplastischen in Cialit konservierten Gehörknöchelchen nach Implantation im Mittelohr der Meerschweinchen und der Menschen. Arch.klin.exp. Ohr.-, Nas.- u.Kehlk.Heilk. 196 (1970) 130.
- (27) Timpl, R.: Antigene Eigenschaften der Bindegewebsstrukturproteine. Med.Mitt.(Melsungen) Bd.43, 112 (1969) 29-38.
- (10) Weichselbaumer, W.: Transplantation der Ossikula. Mschr.Ohrenheilk. 95 (1961) 375.
- (4) Zöllner, F.: Technik der Formung einer Columella aus Knochen. Z.Laryng.Rhinol 39 (1960) 536.

Lebenslauf

Geboren wurde ich am 21.4.1948 in München als Sohn des Dipl.Ingenieurs Emil Schlierf und seiner Ehefrau Anna.

Nach dem Besuch der Volksschule trat ich 1958 in das Maria-Theresia-Gymnasium in München ein, wo ich 1967 die Reifeprüfung ablegte.

Von 1967 - 1969 studierte ich Pharmazie mit dem Abschluß des Pharmazeutischen Vorexamens.

Im Anschluß daran nahm ich das Studium der Medizin an der Universität München auf, legte im Winter 1975 mein Staatsexamen ab und erhielt nach Absolvierung der Medizinalassistentenzeit an verschiedenen Kliniken im Juni 1977 die Approbation.

Es folgte daraufhin die Einberufung zum Wehrdienst, den ich als Stabsarzt ableistete.

Seit Januar 1979 bin ich als Assistenzarzt an der Herzchirurgischen Klinik in Großhadern der Universität München tätig.

